

**KORKEA SOLUVAPAAN DNA:N PITOISUUS  
PLASMASSA ENNUSTAA KUOLLEISUUTTA  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* -  
BAKTEREMIAPOTILAILLA TEHOHOIDOSSA**

Visa Helmijoki  
Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
Tammikuu 2016

HELMIJOKI VISA: KORKEA SOLUVAPAAN DNA:N PITOISUUS PLASMASSA  
ENNUSTAA KUOLLEISUUTTA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* -  
BAKTEREMIAPOTILAILLA TEHOHOIDOSSA

Kirjallinen työ, 11 sivua + tutkimusartikkeli 9 sivua

Ohjaaja: Dosentti, LT Janne-Juhana Aittoniemi, Fimlab Laboratoriot Oy, Tampere

Tammikuu 2016

Avainsanat: cell-free DNA, cf-DNA, soluvapaa DNA, bakteremia, *Staphylococcus aureus*

---

## Tiivistelmä

### Tutkimuksen tausta ja tarkoitus

Bakteremia- ja sepsispotilailla plasman soluvapaa DNA-biomarkkeri liittyy yleisesti potilaan ennusteeseen. Tutkimuksen tarkoituksena oli arvioida soluvapaan DNA:n ennusteellisuutta *Staphylococcus aureus*-bakteremiapotilailla tehohoito-osastoilla ja muilla osastoilla.

### Aineisto ja menetelmät

418 potilasta, joilla todettiin positiivinen *S. aureus*-veriviljelynäyte, seurattiin prospektiivisesti 90 päivän ajan. Potilaat jaettiin kahteen ryhmään: 99 potilasta oli hoidettu tehohoito-osastolla 7 vuorokauden sisällä *S. aureuksen* todentamisesta, kun taas 319 potilasta oli hoidettu muualla kuin tehohoito-osastolla. Pitt-bakteremiapisteet arvioitiin sairaalaan saapumisen yhteydessä ja soluvapaa DNA mitattiin plasmasta 3. ja 5. päivänä positiivisen veriviljelytuloksen jälkeen.

### Tulokset

*S. aureus*-bakteremiapotilailla, joilla todettiin korkeat Pitt-bakteremiapisteet ja joita hoidettiin tehohoito-osastolla, soluvapaan DNA:n arvot olivat korkeammat 3. ja 5. mittauspäivinä kuin heillä, joilla oli matalat Pitt-bakteremiapisteet ja joita hoidettiin muualla kuin tehohoito-osastolla. Tehohoitopotilailla soluvapaan DNA:n arvo  $>1,99 \mu\text{g/ml}$  3. mittauspäivänä ennusti kuolleisuutta 67%:n sensitiivisyydellä ja 77% spesifisyydellä AUC-ROC-arvon ollessa 0,71 ( $p<0,01$ ). Soluvapaan DNA:n arvo  $>1,99 \mu\text{g/ml}$  liittyi vahvasti korkeisiin Pitt-bakteremiapisteisiin ( $\geq 4$  pistettä) ( $p<0.001$ ). Kaikkien ennustetekijöiden arvioinnin jälkeen Pitt-bakteremiapisteet  $\geq 4$  sairaalaan tullessa (OR 4.47,  $p<0.001$ ) ja soluvapaa DNA 3. päivänä (OR 3.56,  $p<0.001$ ) ennustivat kuolleisuutta parhaiten tehohoitopotilailla. Soluvapaan DNA:n 5. päivän mittaustulos oli ennustearvoltaan heikompi kuin 3. päivän tulos. Soluvapaalla DNA:la ei kuitenkaan ollut ennustearvoa muualla kuin tehohoito-osastolla hoidetuilla potilailla.

### Päätelmät

Korkea soluvapaan DNA:n pitoisuus todettiin potilailla, jotka saivat korkeat Pitt -bakteremiapisteet ja jotka olivat tehohoito-osastolla hoidettavina. Pitt-bakteremiapisteet  $\geq 4$  ja korkea soluvapaa DNA 3. päivänä positiivisen veriviljelyn jälkeen ennustivat kuolleisuutta *S. aureus*-potilailla tehohoito-osastolla, ja ne olivat itsenäisiä ennustetekijöitä.

Tämän opinnäytteen alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck-ohjelmalla Tampereen yliopiston laatuja järjestelmän mukaisesti.

## Sisällysluettelo

### 1. Kirjallisuuskatsaus

- 1.1. Soluvapaa DNA
- 1.2. Sepsis ja soluvapaa DNA
- 1.3. Maligniteetit ja soluvapaa DNA
- 1.4. Hengityskonehoito ja soluvapaa DNA
- 1.5. MRSA ja MSSA
- 1.6. *S. aureus*-bakteremia ennen ja nykyisin
- 1.7. Yhteenveto
- 1.8. Lähteet

### 2. Tutkimusartikkeli

Forsblom Erik, Aittoniemi Janne, Ruotsalainen Eeva, Helmijoki Visa, Huttunen Reetta, Jylhävä Juulia, Hurme Mikko, Järvinen Asko. (2014) High Cell-Free DNA Predicts Fatal Outcome among *Staphylococcus aureus* Bacteraemia Patients with Intensive Care Unit Treatment. PLoS ONE 9(2): e87741.

# 1. Kirjallisuuskatsaus

## 1.1 Soluvapaa DNA

Soluvapaa (cell-free, cell free) DNA on herättänyt viime vuosina runsaasti tieteellistä kiinnostusta. Soluvapaan DNA:n alkuperä ja mekanismit, joilla se päätyy plasmaan eivät ole täysin selviä. Nykykäsityksen mukaan sitä muodostuu huomattavia määriä elimistön tulehdussolujen hajotessa apoptoottisesti erilaisissa tautitiloissa ja tulehduksissa. (Huttunen ym. 2011). Sen käyttökelpoisuutta erilaisten tautien diagnostiikassa ja ennusteen arvioinnissa tutkitaan, ja se saattaa osoittautua kliinisessä työssä käyttökelpoiseksi markkeriksi esimerkiksi sepsiksen ja syöpätautien diagnostiikassa. Soluvapaata DNA:ta on todettu terveillä ihmisillä olevan verenkierrassa pieniä mutta havaittavia pitoisuuksia (Wu ym. 2002).

Soluvapaan DNA:n pitoisuus nousee kovan fyysisen rasituksen yhteydessä. 14 ultra-maratoonarin verinäytteitä analysoitiin ennen ja jälkeen 6 tunnin kilpasuoritusta. Soluvapaan DNA:n tasot olivat huomattavasti kohonneet heti maratonin jälkeen ja olivat edelleen koholla 2 tuntia myöhemmin, vaikkakin huomattavasti matalampia. 24 tuntia suorituksen jälkeen pitoisuudet olivat palanneet samalle tasolle kuin ennen suoritusta. (Atamaniuk ym. 2008)

Soluvapaan DNA:n alkuperä sekä mekanismit, joilla plasman soluvapaan DNA:n taso kohoaa, ovat yksi tutkimuksen kohde. Harjoittelutilanteen jälkeisen soluvapaan DNA:n kohonnan pitoisuuden lähde on epäselvä: se on mahdollisesti eri kuin kroonisissa tautitiloissa ilmenevä pitoisuuden kohoaminen. Lähdetä selviteltiin saksalaisessa tutkimuksessa, jossa 7 vapaaehtoista kantasolutransplantaatio- ja maksatransplantaatiopotilasta sekä 6 tervettä vapaaehtoista rasitettiin juoksumattotestillä. Transplantaatiopotilaiden siirteet olivat trans-sukupuolisia ja täten soluvapaan DNA:n lähde oli seurattavissa. Naiskantasolutransplantaatiopotilailla, joilla graffi oli miesperäinen, todettiin harjoitusten yhteydessä huomattavasti kohonneita Y-kromosomisen soluvapaan DNA:n pitoisuuksia sekä kokonais-DNA:n pitoisuuksia. Mieskantasolutransplantaatiopotilailla, joilla graffi oli naisperäinen, alle 10% mitatusta soluvapaasta DNA:sta oli Y-kromosomiperäistä, mutta kokonais-DNA:n määrä oli huomattavasti koholla. Naismaksatransplantaatiopotilailla Y-kromosomaalisen soluvapaan DNA:n taso pysyi matalana koko testin läpi. Vaikkakin fysiologiset ominaisuudet voivat transplantaatiopotilailla olla erilaisia terveisiin henkilöihin verrattuna, vaikuttaa todennäköiseltä että harjoituksen yhteydessä vapautuva soluvapaa DNA on peräisin hematopoeettisista solulinjoista. (Tug ym. 2015)

## 1.2 Sepsis ja soluvapaa DNA

Sepsis on raju infektio, jossa inflammatoriset vasteet ja koagulaatiokaskadi aktivoituvat systeemisesti mikrobi-infektion levitessä normaalisti steriileihin kehon osiin. Runsaasta tutkimustyöstä huolimatta bakteremiassa ja sepsiksessä menehtymiseen johtava patofysiologinen prosessi on edelleen osittain epäselvä. Vakava sepsis ja septinen sokki aiheuttavat haasteita tehohoidossa, ja kuolleisuus siihen on 30-60% luokkaa. Luotettavien prognoottisten tekijöiden löytäminen vakavassa sepsiksessä auttaisi potilaiden riskinarviossa, hoitopaikan valinnassa ja hoidon vasteen arvioinnissa. (Saukkonen ym. 2008)

Soluvapaan DNA:n pitoisuuksien on todettu olevan sitä suuremmat plasmassa, mitä vakavampi septinen infektio on. Menehtyneillä sepsis-potilailla on todettu korkeampia soluvapaan DNA:n pitoisuuksia kuin sepsiksestä selviytyneillä, ja sillä on ennusteellinen merkitys taudin kulun kannalta, mikäli potilaalla ei ole muita soluvapaan DNA:n pitoisuuksia nostavia syitä. (Moreira ym. 2010) (Saukkonen ym. 2008)

Vakavaan sepsikseen tyypillisenä ilmiönä kuuluu apoptoottinen solukuolema. Useat syyt voivat sepsiksessä johtaa hyperlaktatemiaan, apoptoosiin ja elinvarioihin, mutta tärkeimpinä syinä pidetään hypoperfuusiota ja kudosten hypoksemiaa. Jatkuva hapen saannin alimäärä ja kulutuksen ylimäärä johtavat anaerobiseen glykolyysiin ja laktaatin tuottoon. (Saukkonen ym. 2008)

Tämä voi johtaa hyperlaktatemiaan, solujen hypoksemiaan, endoteelisolujen vaurioon ja seurauksena apoptoottiseen solukuolemaan. Apoptoosiin solukuoleman tyyppinä kuuluu sytoplasman tiivistyminen, tuman pirstaloituminen ja tuman kromatiinin tiivistyminen, minkä vuoksi agaroosi-geelielektroforeesissa todettavilla apoptoosiperäisillä DNA-ketjuilla on tyypillinen pituus. Terveessä solussa DNA pakkautuu nukleosomiin, joissa DNA on kiertynyt noin 147 emäsparin pituisina ketjuina histoni-proteiinien ympärille. (Dwiwedi ym. 2012)

On todettu, että soluvapaa DNA esiintyy sepsikseen menehtyneillä potilailla enimmäkseen pienimolekyyliaripainoisina DNA-ketjuina (150-200 emäsparia). Soluvapaan DNA:n ketjujen pituus sopii vastaamaan solujen nukleosomeissa histoni-proteiinien ympärille kiertyneiden DNA-ketjujen pituutta. (Huttunen ym. 2011)

Plasmassa kiertävä DNA on enimmäkseen proteiineihin sitoutunutta nukleosomaalista DNA:ta. Tämä DNA on hajautunutta ja heikosti konsentroitunutta, mikä tekee sen eristämisen haastavaksi.

Sen pitoisuutta voi määrittää polymeraasiketjureaktiolla (PCR) tai entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä (ELISA). Kolmas vaihtoehto soluvapaan DNA:n kokonaismäärän määrittämiseksi on suoraan plasmasta fluorometrisellä menetelmällä mittaaminen. Koska eristämisprosesseja ei tarvita, tämä on nopea ja halpa tapa määrittää plasman soluvapaan DNA:n kokonaispitoisuus, minkä vuoksi menetelmä voi osoittautua hyödylliseksi kliinisessä työssä esimerkiksi bakteremiapotilaiden hoitolinjojen valinnassa. (Huttunen ym. 2011)

Kanadalaisessa retrospektiivisessä tutkimuksessa tarkasteltiin 80:n vakavaa sepsistä sairastaneen potilaan plasmanäytettä. Näytteet kerättiin teho-osastolla saapumispäivänä, päivittäin viikon ajan ja 50 potilaalta vielä toisen viikon ajan. Potilaiden infektiot olivat erilaisia: gram-positiivisia ja gram-negatiivisia bakteeri-infektioita, sienitauteja, sekainfektioita tai tuntemattomia. Soluvapaan DNA:n pitoisuuksissa ei huomattu eroja taudinaiheuttajaryhmien välillä. Soluvapaan DNA:n pitoisuus määritettiin tutkimuksessa spektrofotometrillä mitaten ultraviolettivalon absorbanssia 260 nm aallonpituudella kuten tekemässämme tutkimuksessa. Soluvapaan DNA:n pitoisuus  $>2,35$  ng/ $\mu$ l ennusti potilaan kuolleisuutta teho-osastolla 87,9% sensitiivisyydellä ja 93,5% spesifisyydellä AUC-ROC-arvon ollessa 0,97 (95% luottamusväli 0,93 – 1,00). Tutkijat huomattavat, että tulokset saattavat olla vielä parempia, kun soluvapaa DNA yhdistetään CRP- ja MODS-arvoihin (Multiple Organ Dysfunction Score). (Dwivedi ym. 2012)

Israelilaisessa sairaalassa toteutetussa 70 potilaan tutkimuksessa soluvapaan DNA:n pitoisuus määritettiin fluorometrisesti 535 nm aallonpituudella 12 tunnin sisällä tehohoito-osastolle saapumisen jälkeen. 28 päivän kuluessa menehtyneillä oli suurempi soluvapaan DNA:n mediaanitaso kuin taudista selvinneillä: 3469,0 vs. 1659 ng/ml. AUC-ROC-arvo oli 0,79 (95% luottamusväli 0,69 – 0,88). (Avriel ym. 2014)

### **1.3 Maligniteetit ja soluvapaa DNA**

Soluvapaan DNA:n pitoisuutta nostavat monet muutkin tekijät kuin fyysinen rasitus ja sepsis, kuten fyysinen trauma, syöpä, aivoinfarkti tai sydäninfarkti. Soluvapaan DNA:n roolia kasvainspesifisenä merkkiaineena on tutkittu. Karsinoomissa, leukemioissa ja lymfoomissa on todettu kohonneita pitoisuuksia, ja niiden epäillään liittyvän kasvainten metastaaseihin. Kasvainpotilaan soluvapaa DNA on osittain sirpaloitunutta, sisältäen lyhyempiä (noin 100 emäsparia) DNA-pätkiä kuin normaalista plasmanäytteestä löytyvä soluvapaa DNA. Tässä tutkimuksessa määritettiin myös soluvapaan DNA:n referenssiarvot 20-70-vuotiaille perusterveille henkilöille suoraan plasmanäytteistä mittaamalla. (Wu ym. 2002)

Kuitenkin syöpäpotilailla vain osa plasmassa kiertävästä soluvapaasta DNA:sta on peräisin kasvainsoluista. 30 valikoimattoman syöpäpotilaan tutkimuksessa soluvapaata DNA:ta tutkittiin PCR-menetelmällä. Apoptoottisista tai nekroottisista soluista peräisin ollut DNA erotettiin geelielektroforeesin avulla. Tässä tutkimuksessa apoptoosiperäiseksi tulkittu DNA oli enimmäkseen noin 180 emäsparin pituisina ketjuina, joskin 2, 3 tai 4 kertaa tätä pidempiä ketjuja todettiin jonkin verran, sopien oligonukleosomaalisiksi apoptoottisiksi ketjuiksi. Tutkimuksessa havaittiin myös suuria, yli 10 000 emäsparin pituisia DNA-ketjuja: näiden tulkittiin olevan nekroosissa syntyneitä. Tutkimuksessa todettiin syöpäpotilaan plasman soluvapaan DNA:n pitoisuuksissa suuria eroja. Terveiden kontrollihenkilöiden plasmassa oli todettu keskimäärin 13 ng/ml soluvapaata DNA:ta, kun taas syöpäpotilailla tämä pitoisuus oli välillä 10 – 1000 ng/ml. Pitoisuudella ei todettu olevan selvää korrelaatiota syöpätyypin eikä potilaan kliinisen statuksen mukaan. Tutkimuksessa myös todettiin, että plasman soluvapaasta DNA:sta 3-93% oli peräisin kasvaimesta, joten alkuperässä oli suurta vaihtelua. Ei-kasvainperäinen soluvapaa DNA oli peräisin kasvainta ympäröivästä kudoksesta, joka degeneroituu kasvaimen infiltratoidessa tervettä kudosta. (Jahr ym. 2001)

Tuoreessa seurantatutkimuksessa kartoitettiin soluvapaan DNA:n mahdollisuuksia metastasoituneen kolorektaalisyövän hoidon tehon monitoroinnissa. 52 potilaan joukosta 48:lta onnistuttiin määrittämään kolorektaalisyövälle tyypillistä mutatoitunutta soluvapaata DNA:ta plasmassa, ja sen tasoa tarkkailtiin ennen ensimmäistä hoitokertaa, 3 päivää hoidon jälkeen ja ennen toista hoitokertaa. Huomattavia laskuja mutatoituneen DNA:n tasossa huomattiin ennen toista hoitokertaa, ja nämä laskut korreloivat CT-kuvissa todettuihin hoitovasteisiin 8-10 viikkoa hoidon jälkeen. Suuret laskut viittasivat parempaan hoitovasteeseen pienempiin laskuihin verrattuna. (Tie ym. 2015)

Hematologisten maligniteettipotilaiden hoidossa kemoterapian vuoksi heille kehittyy usein neutropenia. Neutropeenilla potilailla kuume on yleinen oire. 100 tällaisen potilaan prospektiivisessä analyysissä, jossa 21:llä potilaalla todettiin infektiokomplikaatioita, soluvapaa DNA määritettiin kolmena ensimmäisenä kuumepäivänä. Soluvapaan DNA:n pitoisuudessa ei todettu eroja infektiokomplikaatioita saaneen ja komplikaatioita selvinneiden potilaiden kesken minään mittauspäivänä. Kuitenkin akuutin myeloidisen leukemian ensimmäisenä päivänä mitattu korkea soluvapaa DNA / leukosyytti-suhde ennusti sepsiksen tai septisen shokin kehittymistä. Lisätutkimuksia tarvitaan tämän prognostisen mahdollisuuden selvittämiseksi. (Purhonen ym. 2015)

## 1.4 Hengityskonehoito ja soluvapaa DNA

Mekaanisesti ventiloituja potilaita on verrattu seurantatutkimuksessa, jossa indikaatiot mekaaniseen ventilointiin olivat heterogeenisiä: leikkaus, alentunut tajunnan taso, sydämen vajaatoiminta, epäily tai todettu aspiraatio, sepsis, keuhkokuume tai muu hengitystieinfektio, intoksikaatio, massiivinen verensiirto, fyysinen trauma tai pankreatiitti. Ryhmässä todettiin tautiin 90 päivän kuluessa ventiloinnin aloittamisesta menehtyneillä potilailla suurempi soluvapaan DNA:n pitoisuus kuin taudista selvinneillä. On mahdollista, että korkea soluvapaa DNA johtui näissä ryhmissä nimenomaan hypoksemiasta johtuvasta solukuolemasta. Todettiin myös että soluvapaan DNA:n pitoisuus on huomattavasti korkeampi vaikeassa akuutissa pankreatiitissa kuin lievässä pankreatiitissa. (Okkonen ym. 2011)

## 1.5 MRSA ja MSSA

*Staphylococcus aureus* on ihmisellä yleinen patogeeni, arviolta 30% maailman väestöstä kantaa sitä iholla tai hengitystie-epiteelillä. Se on yleinen bakteremian ja endokardiitin aiheuttaja. *S. aureus*-bakteremia on yleisintä ensimmäisen elinvuoden aikana ja vanhuksilla iän lisääntyessä.

Hematogeenisesti levitessään se kykenee aiheuttamaan lukuisia komplikaatioita bakteremian seurauksena. Fibrinogeeniä sitovien proteiiniensa vuoksi se kykenee aiheuttamaan endokardiitin sitoutumalla sekä vaurioituneeseen endokardiumin epiteeliin että tekoläppiin.

Luu on varsin vastustuskykyistä bakteeri-infektioita kohtaan. *S. aureus* ilmentää kuitenkin lukuisia pintaproteiineja, joilla se kykenee sitoutumaan luun matriksiin ja kollageeneihin, kyeten täten aiheuttamaan osteomyeliittiä. Kuten osteomyeliitissä, *S. aureus* kykenee sitoutumaan nivelten solunulkoiseen matriksiin, aiheuttaen septistä artriittia. Yleisimmin se pääsee niveleen hematogeenisesti bakteremiassa nivelen synoviaalin verenkierron kautta.

Vierasesineiden päällä sijaitseviin proteiineihin *S. aureus* pystyy sitoutumaan molekylaarisin sidoksin ja fibrinogeeniä sitovien proteiinien avulla. Sen jälkeen vierasesineen ympärille kehittyy biofilmi, jossa bakteerit voivat sijaita varsin turvassa immuunijärjestelmältä. Näin *S. aureus* pystyy aiheuttamaan mm. tekonivelinfektioita, sydäntahdistininfektioita ja i.v.-katetri-infektioita. Lisäksi se voi bakteremian komplikaatioina aiheuttaa epiduraaliabskesseja, meningiittejä, virtsatieinfektioita ja septisiä tromboflebiittejä. Iho- ja pehmytkudosinfektioille altistavat *S. aureuksen* kyky väistää neutrofiileja ja makrofageja lukuisilla tavoilla: estämällä kemotaksista, välttämällä vasta-aineita, polysakkaridikapselin tuoman suojan avulla ja vastustamalla fagosyyttien tuhoavaa toimintaa.



Lisäksi se aiheuttaa harvakseltaan pneumonioita ja jotkin kannat aiheuttavat graaveja nekrotisoivia pneumonioita. (Tong ym. 2015)

*S. aureus* on globaalisti yleinen bakteeriemisten infektioiden aiheuttaja. Yhdysvalloissa, Kanadassa ja Latinalaisessa Amerikassa *S. aureus* oli bakteremiassa yleisesti eristetty patogeeni, aiheuttaen yli 20% tapauksista. Lukuisat virulenssimekanismit, haastavien ympäristöjen sietokyky ja hyvä potentiaali kehittyä antibioottiresistentiksi vaikuttavat *S. aureuksen* yleisyyteen ihmisen patogeeninä.

Ensimmäiset metisilliini-resistentit *S. aureus* (MRSA)-kannat ilmaantuivat 60-luvun alkupuolella, minkä jälkeen ne ovat levinneet maailmanlaajuisesti, ja niiden osuus *S. aureus*-infektioista on kasvanut melko tasaisesti ainakin 2000-luvun alkuun asti. Yhdysvalloissa MRSA:n osuus *S. aureus*-infektioista on ollut tutkimusten mukaan jopa 30-45%, ja eurooppalaisissakin sairaaloissa niiden osuus on ollut 12-26%. Esiintyvyys on ollut suurempaa eteläisessä Euroopassa (kuten Portugalissa, Italiassa, Kreikassa ja Turkissa). Kaikkein suurin MRSA-osuus on kuitenkin havaittu Aasian-Tyynenmeren alueilla (Taiwan, Singapore, Japani, Hong Kong), jopa yli 60%.

Useat MRSA-kannat ovat resistenttejä myös muille antibioottiryhmille kuin beetalaktaameille ja osa on herkkiä ainoastaan glykopeptidi-antibiooteille, kuten vankomysiinille ja teikoplaniinille. Huolestuttavasti on myös kantoja, joilla on heikentynyt herkkyys myös glykopeptideille, aiheuttaen tarvetta pohtia antimikrobiaalisia hoitomahdollisuuksia tällaisten kantojen varalta. Ensimmäinen vankomysiinille osittain resistentti kanta raportoitiin jo 1997. (Diekema ym. 2001)

Ensimmäinen vankomysiinille täysin resistentti kanta raportoitiin Yhdysvalloissa 2002. Ne ovat onneksi olleet kuitenkin harvinaisia, tällaisia kantoja on raportoitu vuosien 2002-2010 aikana Yhdysvalloissa vain 9 tapausta ja muualla maailmassa vain kaksi: yksi Intiassa ja yksi Iranissa. Vaikka täyden resistenssin aikaansaava mutaatio on huolestuttava, se ei näytä syntyvän herkästi. Osittain resistenttejä kantoja on raportoitu maailmanlaajuisesti lähes jokaiselta mantereelta. (Howden ym. 2010)

MRSA-epidemiaa ei ole onnistuttu ratkaisemaan nykyisillä antibioottihoidoilla. Rokotetta MRSA-patogeenien ulkokuoren polysakkarideja vastaan on yritetty kehittää mutta heikoin tuloksin. *S. aureus* ilmentää infektion eri vaiheissa eri virulenssimekanismeja ja yksittäistä virulenssimekanismia vastaan suunnatun rokotteen epäillään tämän vuoksi olevan tehoton. On ehdotettu, että tehokas rokote tarvitsisi useita vaikutuskohteita. (George Y Liu 2009)

Metisilliini-herkkää *S. aureus* (MSSA)-bakteremiaa on verrattu MRSA-bakteremiaan lukuisissa tutkimuksissa. Useimmissa tutkimuksissa on todettu näiden infektioiden olevan kliinisiltä ominaisuuksiltaan samankaltaisia, kun mittausmenetelminä on käytetty kuumeen kestoa, infektion komplikaatioita, sairaalahoidon kestoa ja kuolleisuutta. Toisaalta, joissakin tutkimuksissa on todettu huomattavasti suurempi kuolleisuus MRSA-bakteremioissa kuin MSSA-bakteremioissa. Näissä tutkimuksissa on kuitenkin ollut yleensä vain pieni potilasotanta ja ne ovat keskittyneet epidemiatilanteisiin. (Tong ym. 2015)

Saksalaisessa tutkimuksessa verrattiin MRSA- ja MSSA-ryhmiä APACHE II-pisteytyksen (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II), sairaalahoidon keston, aikaisempien leikkausten, tehohoitojaksojen ja antibioottihoitojen, i.v.-katetrien käytön, parenteraalisen ravitsemuksen käytön ja endotrakeaalisen intuboinnin osalta. Näistä ainoastaan sairaalahoidon kesto ennen *S. aureus*-bakteremiaa ja tehohoitojakson kesto olivat tilastollisesti merkitseviä kuolleisuuden suhteen. MRSA- ja MSSA-ryhmien välillä ei todettu eroa kuolleisuudessa. Bakteriemioiden kliinisen etenemisen arvioinnissa todettiin, että ainoastaan APACHE II-pistein mitattu taudin vakavuus ennusti taudin etenemistä vakavaan sepsikseen ja septiseen shokkiin. Ryhmien välillä ei ollut eroa inflammatorisessa reaktiossa taudin alkuvaiheessa eikä taudin vakavimmassa vaiheessa 14 päivän sisällä taudin havaitsemisesta. (Wisplinghoff ym. 2001).

### **1.6 *S. aureus*-bakteremia ennen ja nykyisin**

*S. aureus*-bakteremian yleisyys teollistuneissa maissa on 10-30 tapausta 100 000 elinvuotta kohti. Tanskassa on seurattu ilmaantuvuutta pitkään: 1957-vuodesta 1990-vuoteen on ilmaantuvuus noussut 3:ta 20:n 100 000 elinvuotta kohti, minkä jälkeen se on vakiintunut noin 22 tapaukseen 100 000 elinvuotta kohti. Useissa kaupungeissa on seurattu MRSA-bakteremioiden yleisyyttä, ja vuosien 1991 ja 2006 välillä sen osuus on tasaisesti noussut USA:sa Minnesotassa, Kanadassa Calgaryssa ja Quebecissa sekä Englannissa Oxfordshiressa samalla, kun MSSA-bakteremioiden ilmaantuvuus pysyi tasaisena. 2005-vuoden jälkeen kuitenkin MRSA-ilmaantuvuus on useimmilla näistä alueista laskenut, luultavimmin koska tuolloin sairaalahygieniaan ja infektioiden hallintaan on alettu kiinnittämään enemmän huomiota. (Tong ym. 2015)

Sveitsiläisessä retrospektiivisessä seurantakatsauksessa analysoitiin 308 sairaalassa hoidettua *S. aureus*-bakteremiapotilasta. 51% tartunnoista oli hoitoon liittyviä infektioita, loput 49% olivat kotitartuntoja. 2% tartunnoista oli MRSA:n aiheuttamia. Kotitartunnoista suurimmassa osassa

(52%) ei ollut todettavaa infektiotokusta, kun taas hoitoon liittyvistä bakteremiainfektioista 61% johtui i.v.-katetrin kautta levinneestä *S. aureus*-infektiosta. Kokonaiskuolleisuus sairaalassa oli 20%: hoitoon liittyvistä infektiosta menehtymiseen johti 13% kun taas kotitartunnoista 26% johti menehtymiseen. (Kaech ym. 2006)

Verrattuna 13 vuoden takaiseen, 80-luvulla kerätystä potilasaineistosta tehtyyn vastaavaan sveitsiläiseen tutkimukseen kotitartuntojen määrä oli noussut 140%, i.v.-katetrien kautta levinneiden tartuntojen määrä oli noussut 60% ja kokonaiskuolleisuudessa oli 14% lasku. Mahdollisia syitä ennusteen paranemiselle ovat tehohoidon kehittyminen sekä septisen sokin, äkillisen hengitysvajausoireyhtymän ja disseminoituneen intravaskulaarisen koagulopatian (DIC) osuuskien lasku, suurempi i.v.-katetreihin liittyvien infektioiden osuus ja tartuntatautispecialistin konsultointimahdollisuuksien paraneminen. Kaikista sairaalapotilaiden hoitajaksoista *S. aureus*-bakteremioiden osuudessa oli tapahtunut nousua 23% (2,2 vrt 2,7 / 1000 sairaalaepisodia) 13 vuoden aikana. Kaikkien yhteenlaskettujen bakteremioiden osuudessa oli myös tapahtunut nousua (16,3 vrt 20,4 / 1000 sairaalaepisodia), *S. aureuksen* aiheuttaessa tasaisesti 13% bakteremioista. Suonensisäisten huumeiden käyttäjien osuus kotitartuntaisista *S. aureus*-bakteremioista oli noussut huomattavasti (0,02 vrt 0,4 / 1000 sairaalaepisodia).

Itsenäisiä riskitekijöitä menehtymiselle olivat korkea ikä, alkoholismi, immunosuppressio, hemodialyysi, akuutti munuaisten vajaatoiminta ja septinen sokki. Tartuntatautispecialistin konsultointi liittyi vähäisempään kuolleisuuteen (82%:sa tapauksista konsultoitui tartuntatautispecialistia), huolimatta siitä että todennäköisesti kriittisemmin sairaista potilaista konsultoitui herkemmin. Toisaalta terminaalaisesti sairaista potilaista ei mahdollisesti konsultoitu niin herkästi tai potilas menehtyi, ennen kuin tartuntatautispecialistia ehdittiin konsultoida. (Kaech ym. 2006)

Uudehkossa suomalaisessa tutkimuksessa myös todettiin tartuntatautispecialistin konsultaation parantavan MSSA-bakteremiasta selviytymistä. Tutkimuksessa todettiin, että tartuntatautispecialistin suorittama kliininen tutkimus konsultaation perusteella vähensi kuolleisuutta kolmanneksien puhelinkonsultaatioon tai muuhun etäkonsultaatioon verrattuna sekä 28:n että 90:n päivän seurannassa. Kliininen tutkimus lisäsi radiologisten tutkimusten määrää ja täten infektiotokusten ja endokardiitin löytymistä sekä johti pidempään antibiootihoidon kestoon sekä sopivampaan antibioottivalintaan. Puhelinkonsultoituja potilaita hoidettiin useammin teho-osastolla, mikä saattaa osaltaan selittää todettua korkeampaa kuolleisuutta.

Konsultoitamattomilla potilailla oli suuri, 46%:n kuolleisuus 90:n päivän seurannassa. (Forsblom ym. 2013)

## 1.7 Yhteenveto

Elimistössä DNA:ta vapautuu solujen hajotessa apoptoottisesti erityisesti erilaisissa tulehdus- ja tautitiloissa. Plasmasta mitattavan soluvapaan DNA:n käyttömahdollisuuksia erilaisten tautien diagnostiikassa ja ennusteen arvioimisessa tutkitaan aktiivisesti, ja se saattaa osoittautua kliinisessä työssä käyttökelpoiseksi markeriksi esimerkiksi sepsiksen ja syöpätautien diagnostiikassa ja seurannassa. Tutkimuksemme tarkoituksena oli arvioida soluvapaan DNA:n ennusteellisuutta *Staphylococcus aureus*-bakteremiapotilailla tehohoito-osastoilla ja muilla osastoilla.

Tutkimukssamme osoitimme, että plasman soluvapaan DNA:n pitoisuudet olivat korkeammat niillä *S. aureus* -bakteremiapotilailla, joilla oli sairaalaan tulovaiheessa korkeammat Pitt-bakteremiapisteet ja joita hoidettiin tehohoito-osastolla. Soluvapaan DNA:n plasmapitoisuus 3. päivänä positiivisen veriviljelyn jälkeen oli itsenäinen kuolleisuutta ennustava tekijä tehohoitopotilailla.

Soluvapaa DNA vaikutti kliinisessä päätöksenteossa kiinnostavalta markerilta *S. aureuksen* aiheuttamien sepsistilojen ennusteen arvioinnissa tehohoidossa. Lisäksi soluvapaan DNA:n määrittäminen fluorometrisellä määrittelyllä osoittautui nopeaksi ja halvaksi laboratoriomenetelmäksi. Muiden infektioiden, tautitilojen ja kasvaintautien osalta lisää tutkimustietoa tarvitaan vielä soluvapaan DNA:n laajemman käyttökelpoisuuden määrittämiseksi.

## 1.8 Lähteet

Atamaniuk J, Stuhlmeier KM, Vidotto C, Tschan H, Dossenbach-Glaninger A, Mueller MM. (2008) Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. Eur J Appl Physiol. 2008 Nov;104(4): 711-7.

Avriel A, Paryente Wiessman M, Almoq Y, Perl Y, Douvdevani A et al. (2014) Admission cell free DNA levels predict 28-day mortality in patients with severe sepsis in intensive care. PloS One. 2014 Jun 23;9(6): e100514.

Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, et al. (2001) SENTRY Participants Group: Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. Clin Infect Dis 32 Suppl 2: S114–132.

Dwiwedi DJ, Toltil LJ, Swystun LL, Poque J, Liaw KL, Liaw PC et al. (2012) Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis. Crit Care. Aug 13;16(4): R151.

Forsblom E, Ruotsalainen E, Ollgren J, Järvinen A (2013) Telephone Consultation Cannot Replace Bedside Infectious Disease Consultation in the Management of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. Clin Infect Dis. 56 (4): 527-535.

George Y. Liu (2009) Molecular Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Infection. Pediatr Res. 2009 May; 65(5 Pt 2): 71R–77R.

Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML (Jan 2010). Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin. Microbiol. Rev. 23 (1): 99–139.

Huttunen R, Kuparinen T, Jylhävä J, Aittoniemi J, Vuento R, et al. (2011) Fatal Outcome in Bacteremia is Characterized by High Plasma Cell Free DNA Concentration and Apoptotic DNA Fragmentation: A Prospective Cohort Study. PLoS ONE 6(7): e21700.

Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, et al. (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. Cancer Res 61: 1659–65.

Kaech C, Elzi L, Sendi P, Frei R, Laifer G, et al. (2006) Course and outcome of *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a retrospective analysis of 308 episodes in a Swiss tertiary-care centre. Clin Microbiol Infect 12: 345–352.

Moreira VG, Prieto B, Rodriguez JS, Alvarez FV (2010) Usefulness of cell-free plasma DNA, procalcitonin and C-reactive protein as markers of infection in febrile patients. Ann Clin Biochem 47: 253–8.

Okkonen M, Lakkisto P, Korhonen AM, Parviainen I, Reinikainen M, et al. (2011) FINNALI Study Group: Plasma cell-free DNA in patients needing mechanical ventilation. Crit Care 15 (4): R196.

Purhonen AK, Juutilainen A, Vänskä M, Lehtikangas M, Lakkisto P, Pulkki K et al. (2015) Human plasma cell-free DNA as a predictor of infectious complications of neutropenic fever in hematological patients. Infect Dis (Lond). Apr 47(4) : 255-9

Saukkonen K, Lakkisto P, Penttilä V, Varpula M, Karlsson S, et al. (2008) Finnsepsis Study Group: Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock. Clin Chem 54: 1000–7.

Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong HL, Gibbs P, et al. (2015) Circulating Tumor DNA as an Early Marker of Therapeutic Response in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. Ann Oncol. Apr 7. (Epub ahead of print)

Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin. Microbiol. Rev. July 2015 vol. 28 no. 3: 603-661

Tug S, Helmig S, Deichmann ER, Schmeier-Jürchott A, Simon P et al. (2015) Exercise-induced increases in cell free DNA in human plasma originate predominantly from cells of the haematopoietic lineage. Exerc Immunol Rev. 21:164-173.

Wisplinghoff H, Seifert H, Coimbra M, Wenzel RP, Edmond MB (2001) Systemic inflammatory response syndrome in adult patients with nosocomial bloodstream infection due to *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 33: 733–36.

Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao K, Sun CF, et al. (2002) Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. Clin Chim Acta 321: 77–87.